

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

SCIENCE REFERENCE LIBRARY

BC  
08/951,733  
A-4338

(19)

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 052 322  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 81109575.1

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 9/50

(22) Anmeldetag: 09.11.81

(30) Priorität: 10.11.80 DE 3042360

(71) Anmelder: Gersonde, Klaus, Prof. Dr.  
Preusweg 69  
D-5100 Aachen(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
26.05.82 Patentblatt 82/21

(72) Erfinder: Gersonde, Klaus, Prof. Dr. med.  
Preusweg 69  
D-5100 Aachen(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB LI NL SE

(72) Erfinder: Schäl, Wilfried, Dr.  
Tannenwaldweg 27  
D-6380 Bad Homburg(DE)

(74) Vertreter: Biermann, Wilhelm, Dr.-Ing.  
Morillenhang 39  
D-5100 Aachen(DE)

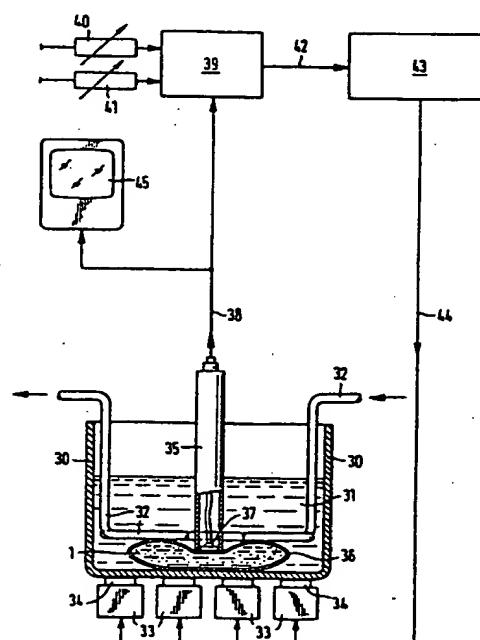
(54) Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln durch Ultraschallbehandlung, Anwendung des Verfahrens und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

(57) Bei einem Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln aus biologischen Membranen oder aus Lipid-Suspensionen, bei dem die zu desintegrierenden Lipid-Suspensionen oder Lipid-Partikel in einer Dispersionsflüssigkeit einer Ultraschallbehandlung unterworfen werden, werden die für den jeweiligen Zweck optimalen Ultraschall-Bedingungen ermittelt. Während der Ultraschallbehandlung unter den ermittelten Bedingungen werden im Reaktionsmedium die Frequenz und die Intensität des Ultraschallfeldes fortlaufend gemessen, und in Abhängigkeit von den gemessenen Istwerten werden die Ausgangsleistung und die Frequenz des den Schwingungsgeber für die Ultraschallwellen speisenden elektrischen Generators zur ständigen Aufrechterhaltung der optimalen Bedingungen nachgeregelt. Die Regelung kann über einen automatischen Regelkreis mit Sollwert-Istwert-Vergleich durchgeführt werden.

Das Verfahren findet insbesondere Anwendung für die Herstellung von für therapeutische Zwecke bestimmten, mit einem Wirkstoff beladenen Lipid-Vesikeln, die zur Fusion mit roten Blutzellen befähigt sind.

EP 0 052 322 A2

Fig. 2



## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von uniformen, unilamellaren sogenannten kleinen Lipid-Vesikeln, insbesondere ein Verfahren zum Überführen von lamellär angeordneten Lipiden in Lipidvesikel, bei dem die zu desintegrierenden Lipid-Strukturen (Lamellen) in einer Suspensionsflüssigkeit innerhalb eines Be- schallungsgefäßes bei im wesentlichen konstanter Temperatur einer Ultraschallbehandlung unterworfen werden. Die Erfindung umfaßt ferner geeignete Vorrichtungen zur Durchführung des Verfahrens.

15 Lipid-Vesikel werden zum Beispiel für medizinisch-therapeutische und wissenschaftliche Zwecke benötigt. Arzneimittel, die einen intrazellulären Wirkort haben, müssen die Zell-Membran passieren können. Viele Effektoren, die den intrazellulären Stoffwechsel kontrollieren und in der Zelle gebildet werden, können die Zelle weder verlassen noch in diese von außen eindringen. Der therapeutische Einsatz dieser Stoff-Klasse macht daher einen Transportmechanismus erforderlich, der es 25 erlaubt, nicht-membran-permeable Stoffe in die Zellen hineinzuschleusen, ohne daß diese Stoffe die Zellen wieder verlassen können. Ein solcher Transportmechanismus soll darüberhinaus möglichst unabhängig von dem zu transportierenden Wirkstoff 30 sein, also jede Art von Effektor transportieren können, andererseits aber Zell-spezifisch sein, d.h. den Transport nur in bestimmte Zellen ermöglichen. Ein Transport-System mit den oben genann-

2

Eigenschaften stellen Lipid-Vesikel dar, welche die verschiedensten Stoffe einschließen können, wie Enzyme, Arzneimittel, Chelat-bildende Substanzen, Hormone, Zell-Effektoren, Antigene, Antikörper,

5 Interferon-Induktoren und Gene. In den Lipid-Vesikeln sind das Lösungsmittel und die im Lösungsmittel gelösten Stoffe von Phospholipid-Doppelschicht-membranen umschlossen. Die Lipid-Membran hat eine Dicke von 4 nm, die Vesikel können einen Durchmesser

10 von 25 bis 120 nm annehmen. Die Größe der Vesikel läßt sich mit Hilfe der Laser-Lichtstreuung, durch Ultrazentrifugation, Gelfiltration oder im Raster-Elektronenmikroskop bestimmen.

15 Ein wichtiges Anwendungsgebiet der Lipid-Vesikel ist die Inkorporierung von Inositolhexaphosphat (IHP) in rote Blutzellen nach dem von Y.C. Nicolau und K. Gersonde beschriebenen Verfahren (US-Patent 4.192.869), zur Herabsetzung der Sauerstoff-Affinität

20 des Hämoglobins. Man weiß nämlich, daß z.B. bei der Lagerung von Blutkonserven die Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins in den roten Blutzellen ständig zunimmt. Ebenso beobachtet man bei bestimmten Krankheiten eine erhöhte Sauerstoff-Affinität des

25 Hämoglobins. Diese erhöhte Sauerstoff-Affinität führt dazu, daß nur ein geringer Anteil des Sauerstoffs, der an Hämoglobin gebunden ist und im Blut zirkuliert, tatsächlich an das Gewebe abgegeben wird. Diese hohe  $O_2$ -Affinität des Hämoglobins

30 kann durch Bindung von bestimmten Effektoren an das Hämoglobin herabgesetzt werden. Der stärkste Effektor dieser Art ist das Inositolhexaphosphat (IHP). Die Inkorporierung von IHP wird erreicht dadurch, daß intakte Zellen mit IHP-bela-

## 3

denen Lipid-Vesikeln inkubiert werden, wobei durch Fusion der Lipid-Membranen der Zelle und der Vesikel IHP in die Zelle eingeschleust wird und dort seine Wirkung erzielt, nämlich die

5 Veränderung der  $O_2$ -Affinität des Hämoglobins, meßbar als "Rechtsverschiebung" der Hämoglobin- $O_2$ -Dissoziationskurve. Nach Rückkehr dieser IHP-beladenen roten Blutzellen in den Kreislauf wird ein erheblich höherer Anteil der in den roten

10 Blutzellen gespeicherten  $O_2$ -Menge in der Peripherie abgegeben. Diese Eigenschaft der modifizierten roten Blutzellen bleibt während des gesamten Lebens der Zelle erhalten.

15 Für die Inkorporierung von Inositolhexaphosphat in rote Blutzellen werden kleine, unilamellare IHP-beladene Lipid-Vesikel mit einem Durchmesser von 20 bis 50 nm benötigt. Es ist bekannt, Lipid-Vesikel durch Desintegration von Lipid-Suspensionen im Ultraschallfeld herzustellen. Der Fortschritt in der Anwendung von Lipid-Vesikeln in der Therapie vollzieht sich bisher nur sehr langsam, da die Herstellung von für die Fusion mit den roten Blutzellen geeigneten Lipid-Vesikeln

20 25 in ausreichender Menge mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist. Die für diesen Zweck geeigneten Lipid-Vesikel müssen nämlich nicht nur in großen Mengen hergestellt werden können, sondern auch reproduzierbar von einheitlicher Größe und

30 somit dosierbar in der therapeutischen Anwendung sein. Die nachträgliche Anwendung von Trennverfahren zum Abtrennen geeigneter Fraktionen der Lipid-Vesikel wirft vielerlei Probleme auf, z.B.

4

Aufrechterhaltung der Sterilität und Anwendung aufwendiger und zeitraubender Trenn-Techniken, die die biologische Effektivität der Vesikel, die nur eine Halb-Lebenszeit von ca. 1 Tag haben, stark vermindern. Das einzige Verfahren, das die Herstellung großer Mengen von Vesikeln in kurzer Zeit erlaubt, ist die Desintegration im Ultraschall. Außer von der Art und Zusammensetzung der Lipid-Membran der Vesikel hängen der Erfolg und die Reproduzierbarkeit der wissenschaftlichen Untersuchung bzw. der therapeutischen Behandlung, d.h. Einschleusung von IHP in rote Blutzellen, wesentlich von der Größe der Lipid-Vesikel ab. Die Kontrolle, ob sich bei der Desintegration der Lipid-Suspension die Lipid-Vesikel in ausreichender Homogenität und somit Qualität und in ausreichender Menge gebildet haben, erfolgt in der Weise, daß man mit den hergestellten Lipid-Vesikeln die gewünschten IHP-Einschleusungsversuche in rote Blutzellen durchführt, das intrazelluläre IHP chemisch nachweist und die Hämoglobin- $O_2$ -Dissoziationskurve intakter Zellen mißt bzw. die gewünschte biologische oder therapeutische Wirkung der IHP-beladenen roten Blutzellen im Tierversuch nachweist. Die Ergebnisse der Versuche bzw. der Erfolg der Behandlung können also erst nach aufwendigen Experimenten beurteilt werden, und der Erfolg der Ultraschallbehandlung, nämlich die Herstellung von für die Fusion mit den roten Blutzellen befähigten Vesikeln, erst im Nachhinein erkannt werden.

Es hat sich gezeigt, daß die Herstellung von Lipid-Vesikeln - insbesondere in großen Volumina, wie sie

für therapeutische Verfahren erforderlich sind - mit gleichbleibenden Eigenschaften mit Hilfe der bekannten Ultraschall-Technik schwierig ist. Trotz Einhaltung anscheinend völlig gleicher äußerer 5 Bedingungen bei der Desintegration der Lipid-Suspensionen im Ultraschallfeld gelingt es bisher nicht, stets die gleiche Ausbeute an sogenannten kleinen unilamellaren und somit fusionswirksamen Lipid-Vesikeln zu erhalten.

10 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das eingangs genannte Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln, die erfolgreich Effektoren in Zellen einschleusen, dahingehend weiterzuentwickeln, daß der Wirkungsgrad des Verfahrens erhöht wird, und daß in reproduzierbarer Weise eine 15 hohe Ausbeute an für den jeweils gewünschten Zweck hochwirksamen Lipid-Vesikeln erzielt wird.

20 Die Erfindung besteht darin, daß die für den gewünschten Zweck wirksamste Vesikelgröße bzw. Vesikelgrößenverteilung, sowie die für die Erzielung dieser Vesikelgröße bzw. Vesikelgrößenverteilung optimale Ultraschall-Frequenz und -Intensität ermittelt wird, und daß die so ermittelte optimale Ultraschall-Frequenz und -Intensität bei im übrigen 25 gleichen Behandlungsbedingungen dadurch konstant gehalten wird, daß während der Ultraschallbehandlung der Istwert der Frequenz und der Intensität des Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium fortlaufend gemessen, und in Abhängigkeit von diesem Istwert die Ausgangsleistung und die Frequenz 30 des den Schwingungsgeber speisenden elektrischen

6

Generators geregelt wird.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß bei Verwendung der Vesikel zu therapeutischen Zwecken Größe bzw. Größenverteilung der Vesikel für die Wirksamkeit derselben von ausschlaggebender Bedeutung ist, und daß andererseits die Größe und Homogenität der im Ultraschallfeld erzeugten Vesikel in empfindlicher Weise von der Konstanz und Intensität des auf die Lipide einwirkenden Ultraschallfeldes abhängen. Während es bisher üblich ist, die in den Schallgeber eingekoppelte Schallenergie zu messen und konstant zu halten, schlägt die Erfindung vor, die in dem Reaktionsmedium wirksame Schallenergie zu messen und gezielt zu verändern, und zwar in der Weise, daß die effektive Schallenergie im Reaktionsmedium selbst auf ihrem optimalen Wert konstantgehalten wird. Durch das Messen der effektiven Schallenergie im Reaktionsmedium selbst, und durch die Verwendung dieses Istwertes zum Regeln der eingekoppelten Schallenergie, werden alle Einflüsse kompensiert, die die effektive Schallintensität und die Schallfrequenz am Vesikel-Bildungsort beeinflussen, wie z.B. unterschiedliche und sich verändernde Absorption der Schallenergie mit fortschreitender Reaktion, sich ändernde geometrische Verhältnisse innerhalb des Reaktionsmediums bei Auftreten von Gasbläschen während der Ultraschallbehandlung, sowie Reflexion eines Frequenzbandes von Schallwellen, das sich mit den vom Schallgeber abgestrahlten Schallwellen überlagert, und gegebenen-

7

falls bei phasenverschobener Überlagerung bis zur Auslöschung der Schallenergie führt.

Wenn man also gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zunächst mit Hilfe der bekannten Untersuchungsmethoden den für den jeweiligen Zweck optimalen Vesikeldurchmesser bzw. die optimale Verteilungskurve der wirksamsten Vesikeldurchmesser feststellt, sodann in einer weiteren Versuchsreihe die optimalen Ultraschallbedingungen wie Frequenz und Schalldruck ermittelt, die zu der gewünschten Verteilungskurve führen, und dann die so ermittelte optimale Ultraschallintensität und Ultraschallfrequenz innerhalb des Reaktionsmediums während der Reaktionsdauer konstant hält, erhält man eine sehr hohe Ausbeute an für den jeweiligen Zweck außerordentlich wirkungsvollen Lipid-Vesikeln.

Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich nicht nur für die Herstellung von Lipid-Vesikeln, sondern mit demselben Erfolg auch zum Behandeln von natürlichen biologischen Membranen und deren Umwandlung in Vesikel anwenden, beispielsweise bei der Erforschung von Funktion und Struktur von Membran-Enzymen. Auch hierfür ist es nämlich erforderlich, die Membran-Enzyme reproduzierbar in Vesikel bestimmter Größe zu überführen, was nach den bekannten Verfahren nicht mit ausreichender Sicherheit möglich ist.

Weitere Einzelheiten und Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nachfolgend anhand der Zeichnungen und anhand von Ausführungsbeispielen

näher beschrieben.

Von den Zeichnungen zeigt:

5 Fig. 1 eine für die Herstellung von kleineren Mengen von Lipid-Vesikel-Suspensionen geeignete Vorrichtung mit den Merkmalen der Erfindung, teilweise in schematischer Darstellung, und

10

15 Fig. 2 eine für die Herstellung von Lipid-Vesikel-Suspensionen in Steril-Packungen für den klinischen Gebrauch in Liter-Quantitäten geeignete Vorrichtung, ebenfalls in teilweise schematischer Darstellung.

20

25 Das Reaktionsmedium 1 in Form einer Suspension eines Lipides in einem geeigneten Dispersionsmittel befindet sich in dem inneren zylinderförmigen Rohr 2 des doppelwandigen gläsernen Reaktionsgefäßes 3. Der Boden des Reaktionsgefäßes 3 weist eine zu dem Reaktionsraum 3 durchgehende Öffnung auf, in die ein Schallauflnehmer 5 eingesetzt ist. Der Schallauflnehmer 5 ist mit Hilfe einer Epoxidharzsenschicht 6 mit der die Öffnung umgebenden Wand 7 verklebt und abgedichtet. Von oben taucht in das Reaktionsmedium 1 ein Ultraschall-Schwingungsgeber 8 ein. Der aus dem Reaktionsgefäß 3 oben herausragende Teil 9 des Schwingungsgebers 8 ist mit einer Kupplung 9 für den Stromanschluß versehen.

30

5 Durch die doppelte Wand des Reaktionsgefäßes wird ein Hohlraum 10 gebildet, der von Kühlwasser durchströmt ist. Die Rohrstützen 11 und 12 dienen zur Zuleitung bzw. zur Abführung des Kühlwassers. Der Rohrstützen 13 führt in den Reaktionsraum oberhalb des Reaktionsmediums 1 und dient zur Zuführung eines Inertgases wie Argon. Nach oben ist der Reaktionsraum abgeschlossen durch einen Deckel 14. Durch die zwischen dem Deckel 14 und dem Ultraschallgeber bzw. der Gefäßwand verbleibenden Spalte kann 10 das unter geringem Oberdruck stehende Inertgas entweichen.

15 Der Schallauflnehmer 5 weist als eigentlichen Schalldruck- bzw. Schallintensitätsempfänger an seinem oberen, mit dem Reaktionsmedium 1 in Kontakt stehenden Ende eine Piezo-Scheibe 18 auf, die in dem dargestellten Fall radial in einem Halterohr eingebaut, und in diesem Halterohr beispielweise mit Epoxidharz eingeklebt und abgedichtet ist. Das von der Piezo-Scheibe 18 gelieferte elektrische Signal ist ein Maß für die effektive Schallfrequenz und die effektive Schallintensität in dem Reaktionsmedium. Dieses elektrische Signal 20 stellt den Istwert des Regelkreises dar und wird über die Leitung 20 dem Regelverstärker 21 zugeführt. Auf dem Oszilloskop 22 können gegebenenfalls die effektive Frequenz und die Schallintensität visuell verfolgt, und erforderlichenfalls 25 von Hand Nachregulierungen der Frequenz und der Ausgangsleistung des Hochfrequenzgenerators 23 vorgenommen werden.

30 Dem Regelverstärker 21 wird über eine Sollwert-

10

Einstell-Vorrichtung 24 der Sollwert für die Ultraschall-Intensität, und über eine Sollwert-Einstell-Vorrichtung 25 der Sollwert für die Ultraschall-Frequenz vorgegeben. Bei Abweichungen der Istwerte der Frequenz und der Intensität des Ultraschallfeldes im Reaktionsmedium von den vorgegebenen Sollwerten wird über die Leitung 26 der Ultraschallgenerator 23 angesteuert, dessen Frequenz und/oder Ausgangsleistung so lange verändert werden, bis die innerhalb des Reaktionsmediums 1 gemessenen effektiven Werte mit den vorgegebenen Sollwerten übereinstimmen. Von dem Hochfrequenzgenerator 23 wird der Ultraschallgeber 8 über die Leitung 28 mit der erforderlichen elektrischen Spannung versorgt.

Die in Fig. 2 dargestellte Vorrichtung eignet sich für die Herstellung von Lipid-Vesikeln in größeren Quantitäten. Das Reaktionsgefäß ist eine oben offene zylindrische rechteckige Wanne 30 aus korrosionsbeständigem Cr-Ni-Stahl. Die Kühlung der Flüssigkeit 31 in dem Reaktionsgefäß erfolgt durch eine Kühlslangenanordnung 32, die in die in der Wanne 30 befindliche Flüssigkeit 31 eingesetzt wird. Unter dem Boden der Wanne 30 sind auf der Außenseite acht elektro-akustische Wandler 33 angeordnet, deren Schwingungsgeber 34 an den Boden der Wanne 30 angekoppelt sind. Die Schallenergie wird so auf die Flüssigkeit 31 in der Wanne 30 übertragen. In die Flüssigkeit 31 taucht von oben der Schall-aufnehmer 35 ein. Das Reaktionsmedium selbst befindet sich in einem verschlossenen Steril-Beutel 36, der durch die Kühlslangenanordnung 32 innerhalb der Flüssigkeit 31 wenig oberhalb des Bodens

11

der Wanne gehalten wird. Der Schallauflnehmer 35 wird so weit abgesenkt, daß der Schallauflnahmkopf, d.h. die Piezo-Scheibe 37, gegen den Steril-Beutel 36 gedrückt wird, und so das Ultraschallfeld in dem Reaktionsmedium erfaßt.

Das von der Piezo-Scheibe 37 gelieferte Signal steuert über die Leitung 38 den Regelverstärker 39 an und liefert diesem die Istwerte für den Regelvorgang.

10 Die Sollwerte für die Frequenz und die Intensität des Ultraschalls werden vorgegeben durch die Sollwert-Vorgabeeinrichtung 40 bzw. 41. Bei Abweichung der Istwerte von den vorgegebenen Sollwerten wird über die Leitung 42 der regelbare elektrische Generator 15 43 angesteuert, dessen an die elektromagnetischen Wandler 33 über die Leitung 44 abgegebene Ausgangsleistung und/oder Frequenz so lange verändert werden, bis Sollwerte und Istwerte übereinstimmen. Die von der Piezo-Scheibe 37 gemessene Frequenz und Amplitude des Ultraschallfeldes können auf dem Oszillographen 45 visuell beobachtet werden, so daß auch ggf. ein manueller Eingriff in die Regelung möglich ist.

Mit Hilfe der beschriebenen Vorrichtungen werden 25 beispielsweise folgende Reaktionen durchgeführt:

Beispiel 1

Es sollen IHP-beladene Lipid-Vesikel für therapeutische Zwecke hergestellt werden, und zwar 30 zur Einschleusung von IHP in rote Blutzellen mittels Fusion zur Verbesserung der  $O_2$ -Freisetzungseigenschaften der roten Blutzellen. Die generelle Methode zur Präparation von Lipid-Vesikeln ist in 35 der US-Patentschrift 4.192.869 beschrieben, auf

die insoweit Bezug genommen wird. Die Lipid-Vesikel sind aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterol im molaren Verhältnis von 8 : 2 : 7 aufgebaut. Diese Lipide werden zunächst in einem organischen Lösungsmittel aus 95 Teilen Chloroform und 5 Teilen Methanol gelöst, um eine homogene Lösung und Mischung dieser Lipide zu erreichen. Dann wird das Lösungsmittel bei 20 Grad Celsius im Rotationsverdampfer entfernt. Der dann im Rundkolben verbleibende Lipid-Film wird mit einer wäßrigen Lösung, welche die biologisch aktive Substanz (hier IHP) enthält, aufgenommen und geschüttelt, so daß sich nunmehr ebene Lipid-Lamellen in dieser Suspension bilden. Diese Suspension enthält Lipide in einer Konzentration von ca. 17 - 200  $\mu$ g/l. Die Suspension ist ferner gesättigt an IHP und zwischen pH 7.0 - 8.0 gepuffert.

In einer vorausgehenden Versuchsreihe wurde festgestellt, daß sich für die Fusion mit Erythrozyten und die Inkorporierung von IHP in Erythrozyten Vesikel eignen, die die oben beschriebene Zusammensetzung haben und die einen Durchmesser von 250 - 500 Å aufweisen. Die Wirksamkeit ist um so größer, je größer der Mengenanteil dieser Vesikel-Formation in dem jeweiligen Präparat ist. Durch eine weitere Versuchsreihe wurde sodann ermittelt, daß sich diese gewünschte Durchmesserverteilung erreichen läßt, wenn die Lipide bei einer in etwa konstanten Temperatur von 37 Grad Celsius mit einer schmalbandigen Schallfrequenz von 20 kHz mit einer effektiven Schallenergie von 3 bis 6 W/  $\text{cm}^2$  beschallt werden.

## 13

Die oben beschriebene Lipid-Suspension wird unter Inertgas in das Reaktionsgefäß 3 (Fig. 1) eingefüllt. Das Reaktionsgefäß wird durch das Rohr 13 mit Argon gespült. An den Sollwert-Einstellvorrichtungen 24 und 25 werden sodann die optimale Schallintensität und die gewünschte Schallfrequenz eingestellt. 5 Die beschriebene Regeleinrichtung sorgt dafür, daß die optimale Schallintensität als effektive, auf die Reaktionsflüssigkeit zur vollen Einwirkung kommende Schallintensität während der gesamten Behandlungszeit eingehalten wird. Die Behandlung dauert 10 30 bis 60 Minuten. Während dieser Zeit wird durch das Kühlwasser die in dem Reaktionsgefäß entwickelte Wärme abgeführt und so die Temperatur 15 konstant gehalten.

Die auf diese Weise erhaltene Vesikel-Suspension wird nun mit roten Blutzellen bei 37 Grad Celsius 20 1 h inkubiert. Danach werden die roten Blutzellen in isotonischem Puffer pH 7,4 gewaschen und die Hämoglobin- $O_2$ -Dissoziationskurve der modifizierten intakten Zellen gemessen. Der Erfolg der IHP-In- 25 korporierung wird als "Rechtsverschiebung" der Hämoglobin- $O_2$ - Dissoziationskurve erkannt. Der durch IHP-Bindung an Hämoglobin maximal erreichbare  $O_2$ - Halbsättigungsdruck beträgt bei 37 Grad Celsius und pH 7.4 95 mmHg.

Der Erfolg der kontrollierten Ultraschall-Methode 30 liegt vor allem darin, daß der maximale IHP-In- korporierungseffekt mit Volumen-Verhältnissen RBC (Rote-Blutzellen): Vesikel oder mit Lipid-Konzen-

trationen erreicht wird, die nur noch 10 % der Werte betragen, die bei der bisher üblichen unkontrollierten Ultraschallanwendung für eine erfolgreiche IHP-Inkorporierung eingesetzt werden mußten. Daraus resultiert ein erheblicher wirtschaftlicher Vorteil, da Lipide teuer sind und nicht wiederverwendet werden können. Daraüberhinaus sind mit der bisher üblichen Methode keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erzielen, die unbedingte Voraussetzung für eine sichere Dosierung in der Therapie sind.

#### Beispiel 2

Bei Lipid-Vesikeln für therapeutische Zwecke besteht die Forderung nach absoluter Keimfreiheit. Da eine Sterilisation der fertigen Vesikel-Suspension auf äußerste Schwierigkeiten stößt, wird folgendes Verfahren angewandt: Die Ausgangskomponenten entsprechend dem Beispiel 1 werden zunächst sterilisiert, und unter sterilen Kaullen in einen ebenfalls sterilisierten Beutel aus Polyäthylen oder Weich-PVC-Folie von etwa 0,5 mm Wandstärke gefüllt. Der Beutel wird steril dicht verschlossen und dann in dem Ultraschallgefäß nach Fig. 2 der Ultraschallwirkung ausgesetzt, wobei der Raum zwischen den Gefäßwänden und dem Beutel mit Wasser ausgefüllt ist. Die Messung der Schallintensität erfolgt in diesem Fall an der Außenseite des Beutels. Unter sonst gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 beschrieben werden die gleichen Ergebnisse erzielt, wenn

15

die den Schwingungsgebern zugeführte Leistung  
etwa um den Faktor 1,65 erhöht wird. Dieser  
bei der vorgegebenen Versuchsanordnung anhand  
der Messungen experimentell ermittelte Faktor  
5 repräsentiert die durch die Einbringung des  
Beutels eintretenden Leistungsverluste.

---

Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln  
durch Ultraschallbehandlung, Anwendung des  
Verfahrens und Vorrichtung zur Durchführung  
des Verfahrens

---

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln  
aus biologischen Membranen oder Lipid-Suspen-  
sionen, bei dem die zu desintegrierenden Lipid-  
Suspensionen oder Lipid-Partikel in einer Dis-  
persionsflüssigkeit innerhalb eines Behandlungs-  
gefäßes bei im wesentlichen konstanter Tempe-  
ratur einer Ultraschallbehandlung unterworfen  
werden, d a d u r c h g e k e n n z e i c h-  
n e t, daß die für den gewünschten Zweck wirk-  
same Vesikelgröße bzw. Vesikelgrößenverteilung,  
sowie die für die Erzielung dieser Vesikel-  
größe bzw. dieser Vesikelgrößenverteilung opti-  
male Ultraschall-Frequenz und -Intensität in  
der Dispersionsflüssigkeit ermittelt, und daß  
die so ermittelte optimale Ultraschall-Frequenz  
und -Intensität bei im übrigen gleichen Behand-  
lungsbedingungen dadurch konstant gehalten wird,

daß während der Ultraschallbehandlung der Istwert der Frequenz und Intensität des Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium fortlaufend gemessen, und in Abhängigkeit von dem  
5 Istwert die Ausgangsleistung und die Frequenz des den Schwingungsgeber speisenden elektrischen Generators geregelt wird.

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Regelung des den Ultraschallgeber speisenden Generators mit Hilfe eines automatischen Regelkreises mit Sollwert-Istwert-Vergleich vorgenommen wird.

15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Messung der Ultraschall-Intensität und -Frequenz ein in die Reaktionsflüssigkeit eintauchender piezoelektrischer Schallaufnehmer verwendet wird.

20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der piezoelektrische Schallaufnehmer am Boden des Reaktionsgefäßes so angeordnet wird, daß die Richtung seiner höchsten Empfindlichkeit gegen den Ultraschallgeber gerichtet ist, während der Ultraschallgeber in das obere  
25 Drittel des Mediums eintaucht.

30 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium unter einer Inertgasatmosphäre behandelt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium sterilisiert und in einem Steril-Beutel eingeschlossen, und der das Reaktionsmedium enthaltende Steril-Beutel innerhalb einer dem Ultraschallfeld ausgesetzten Flüssigkeit behandelt wird.

5

7. Anwendung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von für therapeutische Zwecke bestimmten, mit einem Wirkstoff wie Inositolhexaphosphat beladenen, zur Fusion mit roten Blutzellen befähigten Lipid-Vesikeln.

10

15

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, mit einem die Reaktionsflüssigkeit aufnehmenden Behandlungsgefäß und mindestens einem von einem elektrischen Generator gespeisten elektroakustischen Wandler zur Erzeugung eines Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb des Behandlungsgefäßes (3; 30) als Schallauflnehmer ein akustisch-elektrischer Wandler (18; 37) angeordnet ist, dessen Ausgangssignal zur Regelung der Ultraschall-Intensität und -Frequenz in der Reaktionsflüssigkeit dient.

20

25

30

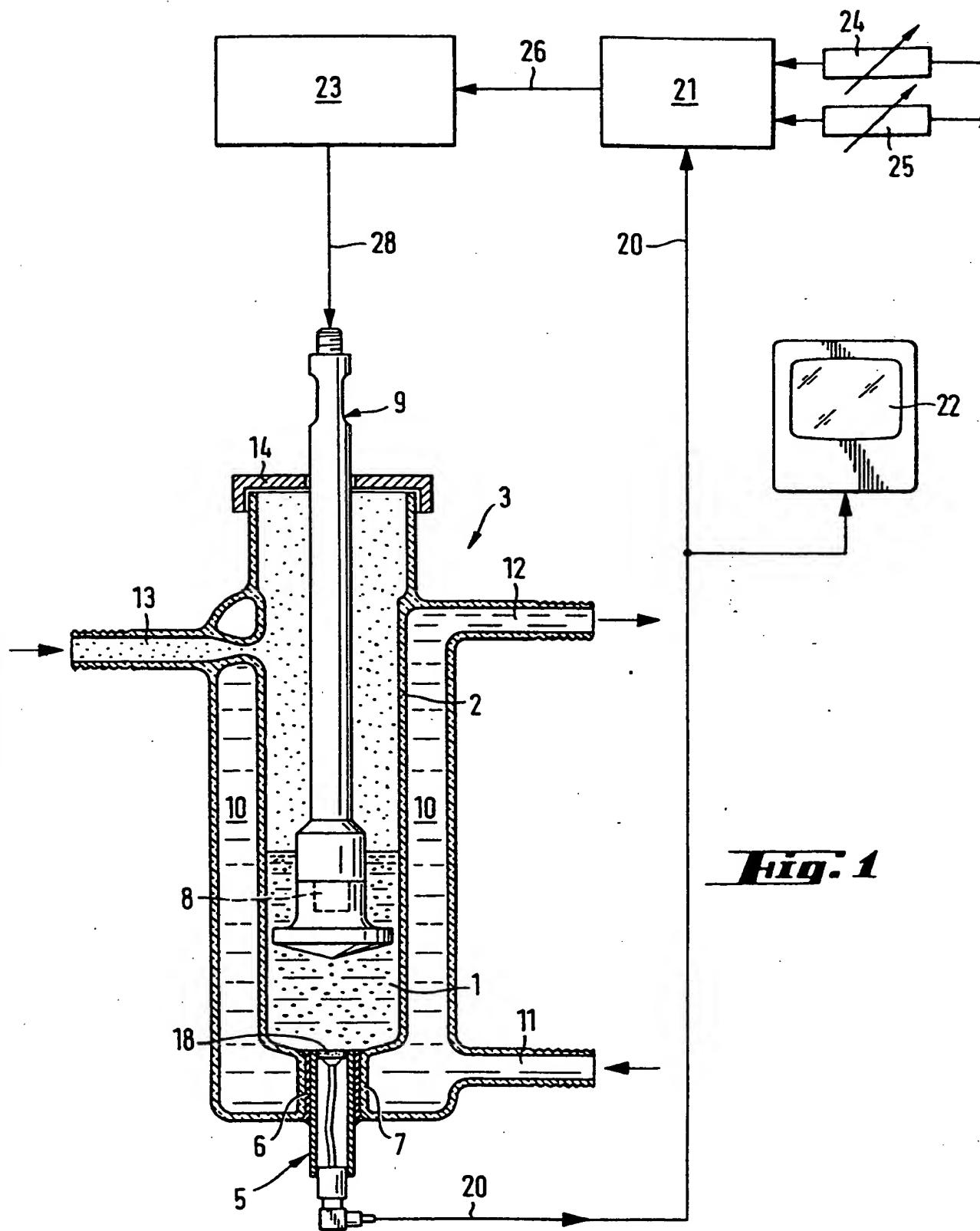
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch einen den elektrischen Generator (23; 43) ansteuernden Regelverstärker (21; 39) mit Sollwert-Istwert-Vergleich.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß der akustisch-elektrische Wandler (18; 37) aus einer am Ende eines Rohres angeordneten Piezo-Scheibe besteht, die mit ihrer gegen Schalldruck empfindlichsten Richtung gegen den Schwingungsgeber gerichtet ist.

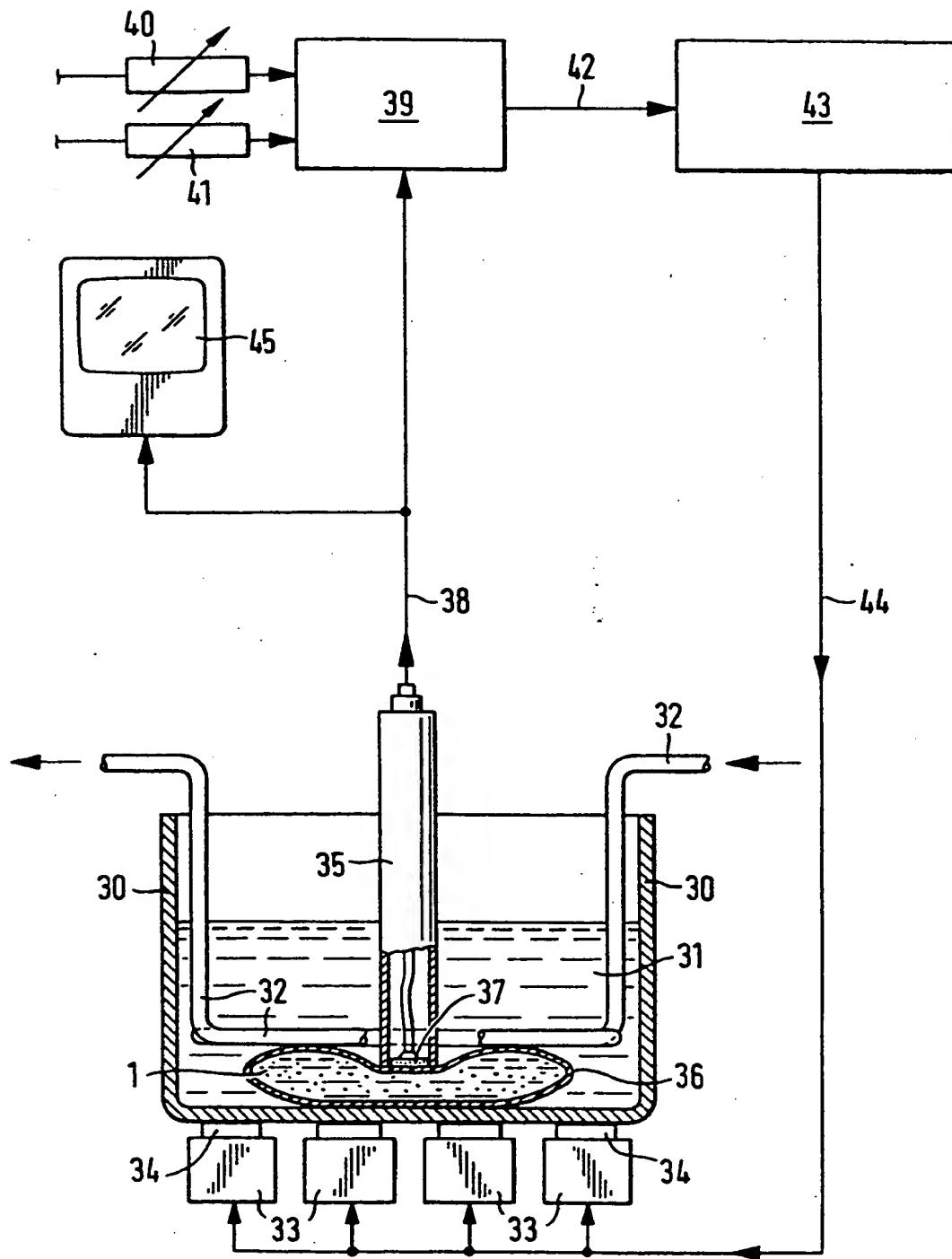
10 11. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Geometrie des Ultraschallgebers und des das Medium aufnehmenden Behandlungsgefäßes (3; 30) so gewählt sind, daß die durch Reflexion verursachte Bildung von Ultraschallwellen mit einer von der Sollfrequenz abweichenden Frequenz und/oder mit gegenüber den primären Ultraschallwellen verschobener Phase in dem beschallten Medium vermieden wird.

15 20 12. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3; 30) von einer Kühlflüssigkeit durchströmte Doppelwände aufweist.

25 30 13. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3) gegen die Außenatmosphäre abgeschlossen ist und eine Zuleitung (13) für die Zufuhr von Inertgas zu dem Gasraum oberhalb des beschallten Reaktionsmediums (1) aufweist.

**Fig. 1**

***Fig. 2***





⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 81109575.1

⑮ Int. Cl.: A 61 K 9/50

⑭ Anmeldetag: 09.11.81

⑩ Priorität: 10.11.80 DE 3042360

⑯ Anmelder: Gersonde, Klaus, Prof. Dr., Preusweg 69,  
D-5100 Aachen (DE)⑪ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 26.05.82  
Patentblatt 82/21⑰ Erfinder: Gersonde, Klaus, Prof. Dr. med., Preusweg 69,  
D-5100 Aachen (DE)  
Erfinder: Schäl, Wilfried, Dr., Tannenwaldweg 27,  
D-6380 Bad Homburg (DE)⑫ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB LI NL  
SE⑯ Vertreter: Biermann, Wilhelm, Dr.-Ing., Morillenhang 39,  
D-5100 Aachen (DE)

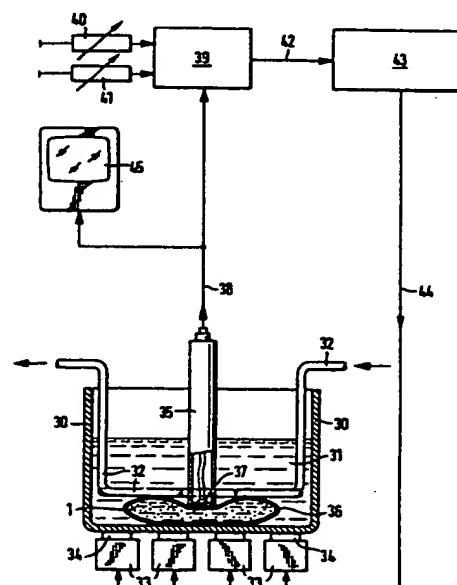
⑭ Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln durch Ultraschallbehandlung, Anwendung des Verfahrens und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

⑮ Verfahren zur Herstellung von Lipid-Vesikeln aus biologischen Membranen oder aus Lipid-Suspensionen, bei dem die zu disintegrerenden Lipid-Suspensionen oder Lipid-Partikel in einer Dispersionsflüssigkeit einer Ultraschallbehandlung unterworfen sind, die für den jeweiligen Zweck optimalen Ultraschall-Bedingungen ermittelt werden. Während der Ultraschallbehandlung werden im Reaktionsmedium (1) die Frequenz und die Intensität des Ultraschallfeldes fortlaufend gemessen, und in Abhängigkeit von den gemessenen Istwerten werden die Ausgangsleistung und die Frequenz des den Schwingungsgeber (34) für die Ultraschallwellen speisenden elektrischen Generators (43) zur ständigen Aufrechterhaltung der optimalen Bedingungen nachgeregelt. Die Regelung kann über einen automatischen Regelkreis mit Sollwert-Istwert-Vergleich durchgeführt werden.

Das Verfahren findet insbesondere Anwendung für die Herstellung von für therapeutische Zwecke bestimmten, mit einem Wirkstoff beladenen Lipid-Vesikeln, die zur Fusion mit roten Blutzellen befähigt sind.

In Fig. 2 ist schematisch eine Vorrichtung dargestellt, die zur Durchführung des anmeldungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. In dieser sind elektro-akustische Wandler mit

EP 0 052 322 A3



(Fortsetzung nächste Seite)

(33) und Schwingungsgeber mit (34) angedeutet. Der Schall-  
aufnehmer (35) wird soweit abgesenkt, daß die Piezo-Schei-  
be (37) gegen den Sterilbeutel (36) gedrückt wird und das  
Ultraschallfeld im Reaktionsmedium (1) erfaßt. Das von der  
Piezo-Scheibe (37) erzeugte Signal liefert dem Regelver-  
stärker (39) die Istwerte. Die Sollwerte für die Frequenz und  
Intensität des Ultraschalls werden durch die Einrichtung  
(40) bzw. (41) vorgegeben. Bei Abweichung der Istwerte von  
den Sollwerten wird über die Leitung (42) der Generator (43)  
angesteuert, und dessen Ausgangsleistung und/oder Fre-  
quenz werden so lange verändert, bis Sollwerte und Istwer-  
te übereinstimmen.



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 3)
X, Y	<p>---</p> <p>FOLIA BIOCH. ET BIOL. GRAECA, Special issue, Band XIV, 1978 TH.C. THEOHARIDES: "Liposomes as carriers of biologically active molecules", Seiten 11-21. * Figur 1; Seite 13, Abschnitt 2 *</p>	1-13	A 61 K 9/50
Y	<p>---</p> <p>DE-A-2 338 503 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO.) * Seite 4, Abschnitt 3 bis Seite 5, Abschnitt 1; Ansprüche 1,9,10 *</p> <p>-----</p>	1-4,8-11	
RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 3)			
A 61 K 9/00			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 04-01-1983	Prüfer BERTE M. J.	
<p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			